

人参多糖和当归多糖诱导人内皮细胞表达造血生长因子的实验研究*

吴宏 姜蓉 郑敏 王亚平

内容提要 目的:研究和论证人参和当归促进血细胞生成及“补气生血”的现代生物学机理。方法:采用造血生长因子生物活性检测与免疫细胞化学等技术,研究经人参多糖(GPS)和当归多糖(APS)诱导的人脐静脉内皮细胞株(Ecv304)上清液(HEcCM)中造血生长因子的活性及粒单系集落刺激因子(GM-CSF)、IL-3和IL-6在内皮细胞的表达。结果:GPS和APS体外诱导制备的HEcCM能显著促进粒单系造血祖细胞(CFU-GM)和多向性造血祖细胞(CFU-Mix)的增殖;同时,GPS和APS能不同程度地促进内皮细胞GM-CSF、IL-3和IL-6蛋白表达。结论:GPS和APS能上调造血微环境中的内皮细胞分泌造血生长因子来调节血细胞的生成。

关键词 人参多糖 当归多糖 内皮细胞 造血祖细胞 造血生长因子

Experimental Study on Effect of Ginseng Polysaccharide and Angelica Polysaccharide in Inducing Hematopoietic Growth Factors in Human Endothelial Cells WU Hong, JIANG Rong, ZHENG Min, et al *Department of Histology and Embryology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing (400016)*

Objective: To explore the modern biological mechanism of Ginseng and Angelica in replenishing Qi to nourish blood. **Methods:** Using biological assay of hematopoietic growth factor and immunocytochemical technique, the hematopoietic growth factor activity in conditioned culture media of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and expression of granulomonocyt colony stimulating factor (GM-CSF), interleukin 3 (IL-3) and interleukin 6 (IL-6) in the endothelial cells were determined. **Results:** Ginseng polysaccharide (GPS) and Angelica polysaccharide (APS) could markedly promote the proliferation and differentiation of colony forming unit-granulocyte macrophage (CFU-GM) and CFU-Mix in the culture media of HUVEC, and enhance the expression of GM-CSF, IL-3 and IL-6 in various degrees. **Conclusion:** GSP and ASP could up-regulate the endothelial cells expression to secrete hematopoietic growth factors in the micro-environment so as to up-regulate the hematopoiesis.

Key words Ginseng polysaccharide, Angelica polysaccharide, endothelial cell, hematopoietic progenitors, hematopoietic growth factor

血管内皮细胞(EC)是造血诱导微环境的重要组成部分。EC能分泌多种细胞因子调控造血^(1,2)。人参与当归是中医学的“补气”和“补血”要药,人参多糖(GPS)和当归多糖(APS)为其主要药物成分之一。本研究采用造血生长因子生物活性检测与免疫细胞化学等技术,探讨GPS和APS诱导人内皮细胞表达粒单系集落刺激因子(GM-CSF)、IL-3、IL-6与促进人造血祖细胞增殖分化的相互关系。

材料与方法

1 药品 人参多糖(Ginseng Polysaccharide, GPS):

重庆中药研究所分离、提取、纯化,纯度>90%;当归多糖(Angelica polysaccharide, APS):兰州医学院血液病研究所惠赠,纯度>85%。

2 细胞 人脐静脉内皮细胞株(Ecv304)购自中国科学院上海细胞生物研究所。人骨髓细胞(hBMC)取自本校外科手术切除肋骨,供髓者无放、化疗史,骨髓细胞涂片检查无造血系统异常。淋巴细胞分离液分离骨髓单个核细胞,RPMI-1640培养液洗涤,过4号针头制备单细胞悬液。

3 主要试剂 RPMI-1640培养基、IMDM培养基、甲基纤维素,美国GIBCO公司产品;马血清、重组人白细胞介素-3(rhIL-3)和红细胞生成素(EPO),中国军事医学科学院提供;小牛血清,购自杭州四季青公

* 国家自然科学基金资助课题(No. 39870912)

重庆医科大学基础医学院组胚教研室(重庆 400016)

司,重组人粒单系集落刺激因子(rhGM-CSF),北京北医联合生物工程公司产品 ;rhIL-1 ,北京北方同正生物技术公司分装 ;大鼠抗人 GM-CSF 单克隆抗体 ,美国 Pharmingen 公司产品 ;大鼠抗人 IL-3、IL-6 单克隆抗体 美国 Santa Cruz 公司产品 过氧化物酶标记的链霉卵白素染色试剂盒 ,北京中山生物技术有限公司产品。

4 内皮细胞培养上清液(HEcCM)制备 在含 10%小牛血清 RPMI-1640 培养液中常规传代培养 ,待内皮细胞铺满瓶底后进行分组 ,对照组 :常规培养 ,不加任何刺激物 ;IL-1 组 培养体系中加入 IL-1(终浓度为 100U/ml) ;GPS 组 :培养体系中加入 GPS(终浓度为 50 μ g/ml) ;APS 组 培养体系中加入 APS(终浓度为 200 μ g/ml) 。培养 1 天 ,收集上清液。

5 造血生长因子活性检测 粒单系祖细胞 (CFU-GM) 培养采用本室常规方法⁽³⁾ ,人多向性造血祖细胞 (CFU-Mix) 的体外甲基纤维素培养参照《血液实验学》⁽⁴⁾ ,在 CFU-GM 和 CFU-Mix 培养中设置 :对照组 :常规培养 ;实验对照组(HEcCM 组) :常规培养的基础上加入 10%(V/V) 未经刺激的 HEcCM ;GPS 组 :常规培养的基础上加入 10%(V/V) 经 GPS 诱导制备的 HEcCM ;APS 组 :常规培养的基础上加入 10%(V/V) 经 APS 诱导制备的 HEcCM ;IL-1 组 :常规培养的基础上加入 10%(V/V) 经 IL-1 诱导制备的 HEcCM。以每种植 1 \times 10⁵ 个骨髓有核细胞所生成的 CFU-GM、CFU-Mix 集落数评价各种 HEcCM 中造血生长因子生物学活性。

6 GM-CSF、IL-3 和 IL-6 蛋白表达 采用 SP 免疫细胞化学法检测各组(作用浓度和时间同 4)的内皮细胞胞质中 GM-CSF、IL-3 和 IL-6 蛋白表达情况。并设置不加一抗的阴性对照组。光镜下计数 300 个细胞 / 每张载片 ,计算 3 种造血生长因子蛋白表达阳性率及阳性强度(强阳性(+++) ,阳性(++) ,弱阳性(+) ,阴性(-) ,分别计为 3、2、1 和 0 分) ,求出表达的积分指数(积分指数 = 阳性百分率 \times 强度计分)。

7 统计学方法 所获数据经计算机 SAS 统计软件处理 ,进行方差分析和 t 检验。

结 果

1 GPS 和 APS 诱导制备的 HEcCM 中所含造血生长因子生物学活性的检测 常规制备的 HEcCM 对 CFU-GM 和 CFU-Mix 的增殖分化有一定刺激作用 ,而经 IL-1 或 GPS、APS 体外诱导制备的 HEcCM 能显著促进 CFU-GM 和 CFU-Mix 的增殖(图 1、图 2)。提示 GPS 和 APS 能诱导血管内皮细胞生成造血生长因

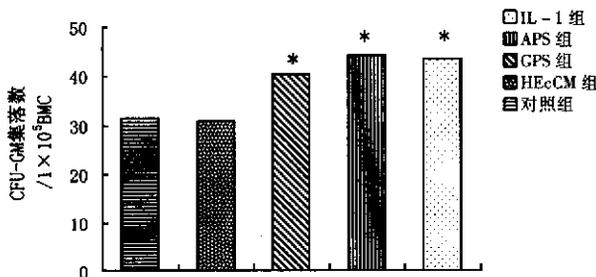


图 1 GPS 和 APS 诱导制备的 HEcCM 对 CFU-GM 增殖的影响

注 :与 HEcCM 组比较 , * $P < 0.05$; $n = 16$ 图 2 同

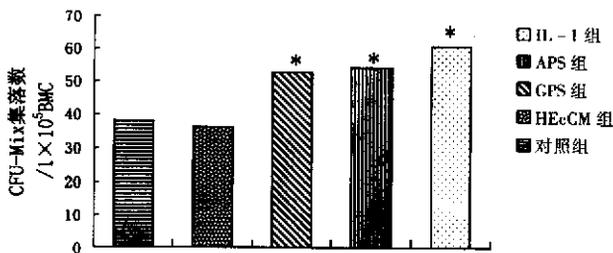


图 2 GPS 和 APS 诱导制备的 HEcCM 对 CFU-Mix 增殖的影响

子样活性。

2 GPS 和 APS 对 GM-CSF、IL-3 和 IL-6 蛋白表达的影响 免疫细胞化学检测显示静止状态下 EC 胞浆内 GM-CSF 和 IL-6 蛋白表达阳性率及强度均很低 , EC 胞浆内几乎无 IL-3 蛋白表达 ,经 IL-1 或 GPS、APS 体外诱导 1 天后内皮细胞表达 GM-CSF、IL-3 和 IL-6 蛋白的阳性率和阳性强度均明显提高 ,且与对照组比较差异有显著性(图 A、B、C、D、E、F 表 1)。

讨 论

既往研究证明^(4、5) :人参多糖、当归多糖是人参和当归“补气生血”或促进血细胞生成的有效成分 ,对髓系造血干(祖)细胞的增殖分化有明确的调控作用 ,但其机理尚不清楚。内皮细胞是造血微环境中的重要基质细胞成分 ,它可通过分泌造血生长因子(HGF)对血细胞发生进行调控⁽⁶⁾。Candal 等⁽⁷⁾研究发现在骨髓内皮细胞培养上清中含有干细胞因子(SCF)、IL-6、GM-CSF、IL-1 α 、IL-11 和粒系集落刺激因子(G-CSF) ,其上清可扩增由脐带血单个核细胞富集的 CD₃₄⁺ 细胞。Jazwiec 等⁽⁸⁾证明在脐静脉内皮细胞与 CD₃₄⁺ 细胞协同培养的上清中可检测到 IL-6、LIF、G-CSF、GM-

表 1 GPS 和 APS 对内皮细胞表达 GM-CSF、IL-3 和 IL-6 的影响 (n=4, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	表达阳性率(%)			积分指数		
		GM-CSF	IL-3	IL-6	GM-CSF	IL-3	IL-6
对照	16	9.85 ± 1.03	3.21 ± 1.18	8.55 ± 1.12	0.15 ± 0.07	0.06 ± 0.01	0.14 ± 0.05
GPS 诱导	16	36.98 ± 2.86*	24.79 ± 2.14*	34.53 ± 2.15*	0.79 ± 0.14*	0.58 ± 0.09*	0.81 ± 0.16*
APS 诱导	16	38.55 ± 3.01*	26.39 ± 2.64*	35.27 ± 2.07*	0.81 ± 0.16*	0.59 ± 0.12*	0.75 ± 0.09*
IL-1 诱导	16	39.67 ± 2.45*	31.71 ± 2.63*	35.43 ± 3.24*	0.84 ± 0.20*	0.63 ± 0.17*	0.74 ± 0.21*

注:与对照组比较,*P<0.01

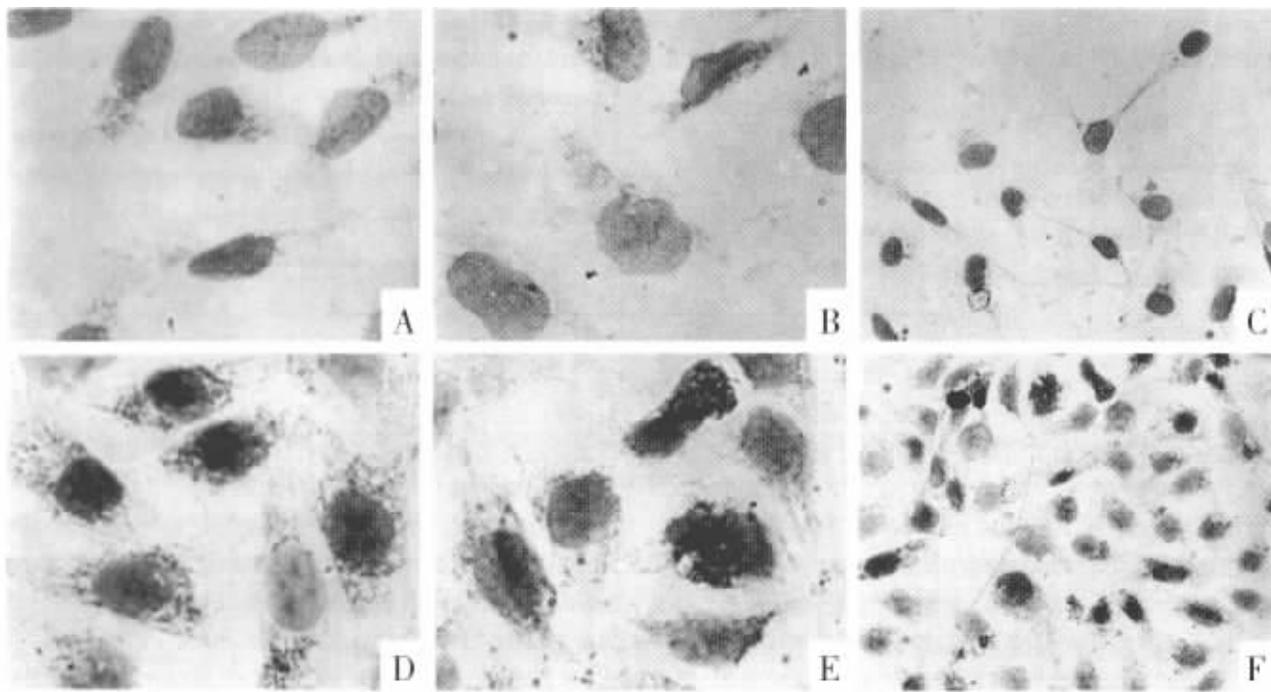


图 A 静止状态下内皮细胞的 GM-CSF 蛋白表达水平较低(ICC × 1000);图 B 静止状态下内皮细胞的 IL-6 蛋白表达水平较低(ICC × 1000);图 C 静止状态下内皮细胞的 IL-3 蛋白表达水平较低(ICC × 200);图 D GPS 诱导 24h 后,内皮细胞 GM-CSF 蛋白表达显著提高(ICC × 1000);图 E GPS 诱导 24h 后,内皮细胞 IL-6 蛋白表达明显提高(ICC × 1000);图 F APS 诱导 24h 后,内皮细胞 IL-3 蛋白表达显著增加(ICC × 200)

CSF、单核细胞集落刺激因子(M-CSF)、IL-1 α 和糖皮质激素并不直接作用于造血祖细胞,但它们可以分别上调和下调内皮细胞表达造血生长因子而间接调控造血。从造血干细胞到造血祖细胞的增殖分化直至成熟血细胞的形成过程中,存在着多种造血生长因子的网络性调控作用,其中造血祖细胞是造血调控的重要阶段,造血祖细胞膜上有 HGF 受体,可受相应 HGF 调节,形成不同集落,因此,造血祖细胞体外培养能检测 HGF 的生物学活性。本研究采用造血祖细胞体外培养技术,研究 GPS 和 APS 对人脐静脉内皮细胞株 Ecv304 分泌造血生长因子的影响及其与血细胞发生的相互关系,结果表明,经 GPS、APS 或 IL-1 诱导制备的内皮细胞培养上清液对 CFU-GM 和 CFU-Mix 的增殖分化有明显促进作用,提示其中 HGF 含量或活性有所增加。我们推测 GPS 和 APS 对内皮细胞表达 HGF

具有明显的刺激作用。

机体内多种细胞和组织可产生 GM-CSF,尤其是活化的 T 淋巴细胞、IL-1 诱导的巨噬细胞、成纤维细胞及内皮细胞等。IL-3 在体内主要由活化的 T 淋巴细胞产生,是刺激造血干细胞、髓系和淋巴系细胞增殖分化的集落刺激因子⁽⁹⁾。IL-6 可诱导骨髓造血干细胞生长和巨核细胞成熟,在造血调控中与 GM-CSF 和 IL-3 有协同作用。研究 HGF 的蛋白表达及调控能深入阐明造血调控的分子生物学机理。HGF 生物学活性检测仅反映了内皮细胞条件培养液所含 HGF 的生物学活性,HGF 有其多效性和丰余性的特点,为进一步阐明 GPS 和 APS 能诱导和影响哪些 HGF 表达,本研究采用免疫细胞化学 SP 法对内皮细胞的 GM-CSF、IL-3 和 IL-6 蛋白表达进行检测,结果表明:IL-1 或 GPS、APS 诱导后内皮细胞的 GM-CSF、IL-3 和 IL-6

蛋白表达阳性率和强度积分值均显著高于对照组,这与生物学活性检测的结果相吻合。我们的研究结果提示 GPS 和 APS 调控造血的机理之一是上调造血微环境中的内皮细胞分泌造血调控因子来调节血细胞的生成。

参 考 文 献

1. Krishnaswamy G, Kelley J, Yerra L, et al. Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: Molecular regulation and possible role in human disease. *J Interferon and Cytokine Res* 1999; 19(2):91—104.
2. Rafii S, Mohle R, Shapiro F, et al. Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium. *Leukemia and Lymphoma* 1997 27:375—382.
3. 王亚平, 祝彼得. 当归多糖对造血祖细胞增殖调控机理的研究. *中华医学杂志* 1996; 76(5):363—366.

4. 李家增, 王鸿利, 韩忠朝, 主编. 血液实验学. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 126.
5. 王亚平, 祝彼得. 当归多糖对小鼠多能造血干细胞增殖分化的影响. *中国中西医结合杂志(增刊)* 1993; 13: 119—121.
6. 陈文杰, 主编. 血液分子细胞生物学. 北京: 中国医药科技出版社, 1994: 36.
7. Candal FJ, Rafii S, Parker JT, et al. BMEC-1: A human bone marrow microvascular endothelial cell line with primary cell characteristics. *Microvasc Res* 1996; 52(3):221—234.
8. Jazwiec B, Solanilla A, Grosset C, et al. Endothelial cell support of hematopoiesis is differentially altered by IL-1 and glucocorticoids. *Leukemia* 1998; 12(8):1210—1220.
9. Ganser A, Lindemann A, Seipelt G, et al. Effect of recombinant human IL-3 in patients with normal hematopoiesis and in patients with bone marrow failure. *Blood* 1990; 76(4):666—676.

(收稿 2001-09-25 修回 2002-02-03)

活络止痛片治疗骨痹的临床观察

黄霖 杨辉

从 1995 年开始, 我们采用活络止痛片治疗骨痹, 获得较好的疗效。现报告如下。

临床资料 105 例 均在中医老年病专科门诊治疗, 采用随机数表法随机分为治疗组与对照组。治疗组 64 例, 男 28 例, 女 36 例, 年龄 42~78 岁, 平均 61.6 岁, 病程 1~14 年, 平均 5~8 年, 部位: 膝关节退行性变 46 例, 腰椎退行性变 18 例。对照组 61 例, 男 27 例, 女 34 例, 年龄 43~76 岁, 平均 63.1 岁, 病程 8 个月~13 年, 平均 5~6 年, 部位: 膝关节退行性变 39 例, 腰椎退行性变 22 例。两组在性别、年龄、病程、病变部位方面基本相似, 经统计学分析, 差异无显著性 ($P < 0.05$)。

诊断标准 依据《中医病证诊断疗效标准》的骨痹诊断依据。即 (1) 腰腿、腰脊、膝关节隐隐作痛, 屈伸、俯仰、转侧不利, 反复缠绵不愈。(2) 起病隐袭, 发病缓慢, 多见于中老年人。(3) 局部关节轻度肿胀, 活动时关节有喀刺声或磨擦声。严重者肌肉萎缩, 关节畸形, 腰弯背驼。(4) X 片检查: 提示骨质疏松, 关节面不规则, 关节间隙狭窄, 软骨下骨质硬化, 以及边缘唇样改变, 骨赘形成。(5) 查血沉、抗“O”、粘蛋白、类风湿因子等, 排除风湿性关节炎及类风湿性关节炎。

治疗方法 治疗组: 口服活络止痛片(由广东省饶平制药厂加工制成。组成: 肉苁蓉、桑寄生、蕲蛇、防风、川乌、三七、元胡、大黄等, 每片药含生药 1g), 每日 3 次, 每次 5 片, 饭后开水送服, 连服 3 个月。对照组: 口服壮骨关节丸(南方制药厂, 组成: 狗脊、仙灵脾、独活、骨碎补、木香、鸡血藤、川断、熟地等), 每日 2 次, 每次 6g, 早晚饭后开水送服, 连服 3 个月。两组病例均停用其他中、西药物, 每周观察记录 1 次, 连续治疗 3 个月后

评定疗效及 X 线摄片复查, 停药 3 个月后追踪观察。

结 果

1 疗效评定标准 按《中医病证诊断疗效标准》的骨痹疗效评定标准。治愈: 关节疼痛, 肿胀消失, 活动功能恢复正常。好转: 关节肿胀、疼痛减轻, 活动功能好转。未愈: 关节疼痛及肿胀无变化。

2 疗效 治疗组 64 例, 治愈 41 例(64.1%), 好转 7 例(10.9%), 未愈 16 例(25.0%), 总有效率为 75.0%; 对照组 61 例, 治愈 28 例(45.9%), 好转 8 例(13.1%), 未愈 25 例(41.0%), 总有效率为 59.0%, 经 χ^2 检验, 治疗组疗效显著优于对照组 ($P < 0.01$)。

3 X 线影像指标 治疗 3 个月后复查, 治疗组 64 例中, 59 例(92.2%) X 线表现与治疗前比较相差不大, 5 例则有不同程度的变化, 如骨质疏松增加, 关节间狭窄, 骨赘增大等。说明活络止痛片治疗骨痹, 能延缓、减轻骨质的退行性改变。

讨 论 骨痹是由于年老体衰, 肾精亏损, 骨失滋养, 气血失调所致的局部和全身骨关节退行性变, 以肾虚精亏为本, 寒凝、瘀血为标, 骨失所养而致关节畸形, 肌肉萎缩, 寒凝、瘀血而致局部疼痛、肿胀, 功能障碍。治疗上, 以补肾壮骨荣筋为治本, 祛风、散寒、祛瘀、通痹为治标。活络止痛片能达到标本兼治的功效。方中肉苁蓉补肾填精, 桑寄生补肾通经络, 共为君药, 蕲蛇、防风祛风搜邪, 川乌散寒, 三七、元胡活血祛瘀通经, 均为辅药, 佐以大黄清骨火以通痹, 合用而有补肾填精, 壮骨蠲痹之效。全方补而不膩, 温而不燥, 疗效佳, 兼可长期服用而无温燥之余, 故尤适用于骨痹。

(收稿 2001-07-15 修回 2002-04-05)